Einfache Trennung von Dehydrogenasen an einem neu entwickelten Affinitätssorbens

Harald Pauli

Diss. Frankfurt am Main
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523703_0003

Aus dem Gustav-Embden-Zentrum
der Biologischen Chemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main
Abteilung für Enzymologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. C. Woenckhaus

Einfache Trennung von Dehydrogenasen an einem neu entwickelten Affinitätssorbens

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin
des Fachbereiches
Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-
Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Harald Pauli aus Hanau

Frankfurt am Main 1982

Dekan : Prof. Dr. med. H. J. Müller

Referent : Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. C. Woenckhaus

Korreferent : Prof. Dr. med., Dr. med. dent. F. Kreter

Tag der mündlichen Prüfung : 24. 10. 1984

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Prof. Dr. Dr. C. Woenckhaus
danke ich für die Themenstellung
und das stete Interesse am Fort-
gang dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem
Herrn Privatdozent Dr. R. Jeck
für seinen Rat.

Inhaltsverzeichnis Seite

Einleitung

Affinitätschromatographie 1

Träger und Spacer 2

Liganden bei Dehydrogenasen 6

Elution 7

Problem und Aufgabenstellung 8

Allgemeiner Teil 10

Aktivierung des Liganden 10

Vorbehandlung und Reduktion der Matrix 11

Kopplungsschritt 14

Ligandenkonzentration - Theoretische Überlegungen und Bestimmungsmethoden 14

Untersuchung des Trennverhaltens 22

Diskussion 29

Zusammenfassung 33

Praktischer Teil

Bromierung von [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat 35

Reduktion der Thiopropyl-Sepharose 6B und Immobilisierung des Coenzymanalogon 36

Blockierung freier SH-Gruppen 36

Versuche zur affinitätschromatographischen Trennung NAD-abhängiger Dehydrogenasen von Fremdprotein 37

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase 37

Alkohol-Dehydrogenase (Leber) 38

Lactat-Dehydrogenase 39

Alkohol-Dehydrogenase (Hefe) 41

Methoden

Quantitative Phosphatbestimmung 43

Aktivitätsbestimmungen 46

Aktivitätsbestimmung von GAPDH, LDH,
ADH_L und ADH_H 48

Quantitative Proteinbestimmung 49

Materialien

Biuretreagens 50

Reaktionslösung für Cyanid-Addition 50

D-GAP-Stammlösung 50

Pufferlösungen 51

Füllmaterialien 53

Biomaterialien und Chemikalien 54

Geräte 55

Literaturverzeichnis 57

Abkürzungen 56

Einleitung

Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eine Säulenchromatographie, zugleich aber nach dem physikalisch-chemischen Trennprinzip eine Adsorptions-Chromatographie, bei der jedoch das Säulenmaterial biologische Affinität zu der zu isolierenden Substanz besitzt. Sie unterscheidet sich dadurch von der üblichen Chromatographietechnik, bei der die Trennung durch gröbere physikalische und chemische Unterschiede zwischen den Stoffen bewirkt wird. Die Affinitätschromatographie bietet die Möglichkeit der Trennung von Substanzen nach ihrer biologischen Funktion, das heißt, es wird die Fähigkeit der Proteine (z.B. Enzyme) eine spezifische und reversible Bindung mit verschiedenen Liganden einzugehen ausgenutzt (1).
Auf die Arbeiten von Anfinsen und Mitarbeitern zurückgehend hat der Begriff der Affinitätschromatographie folgendes Prinzip als Grundlage:
Von zwei Komponenten mit biologischer oder biospezifischer Affinität zueinander (z.B. Enzym und Coenzym, Antigen und Antikörper) wird meistens die niedermolekulare der beiden als Ligand auf einem unlöslichen Trägermaterial immobilisiert und stellt zusammen mit der Matrix die stationäre Phase eines chromatographischen Systems dar. Die sich in der mobilen Phase befindende hochmolekulare zweite Komponente wird aufgrund ihrer biospezifischen

Affinität zu dem Liganden an dem Träger adsorbiert. Jene Makromoleküle, die zu dem jeweiligen Liganden die höchste biologische Affinität haben, können so selektiv aus einer Protein-Mischung isoliert werden, während die geringere Affinität der übrigen Eiweiße nur zu einer schwachen oder keiner Bindung führt und ein Weiterwandern mit der mobilen Phase gestattet (2,3).
Immobilisieren im obigen Sinne heißt, durch eine chemische Reaktion eine kovalente Bindung zwischen der Matrix, die den festen Träger darstellt, und dem Liganden auszubilden.

Träger und Spacer

Die richtige Wahl des Trägers für den Liganden ist für eine erfolgreiche Anwendung einer biospezifischen Adsorption von großer Bedeutung. Es werden daher eine Reihe von Forderungen an den idealen Träger gestellt (4), die dieser nach Möglichkeit erfüllen sollte:

Unlöslichkeit

Genügende Permeabilität

Geeignete Partikelform und mechanische Widerstandsfähigkeit

Null-Adsorptionskapazität

Genügend chemische Reaktivität, die eine Verknüpfung des Trägers mit Raumgruppen und Liganden ermöglicht

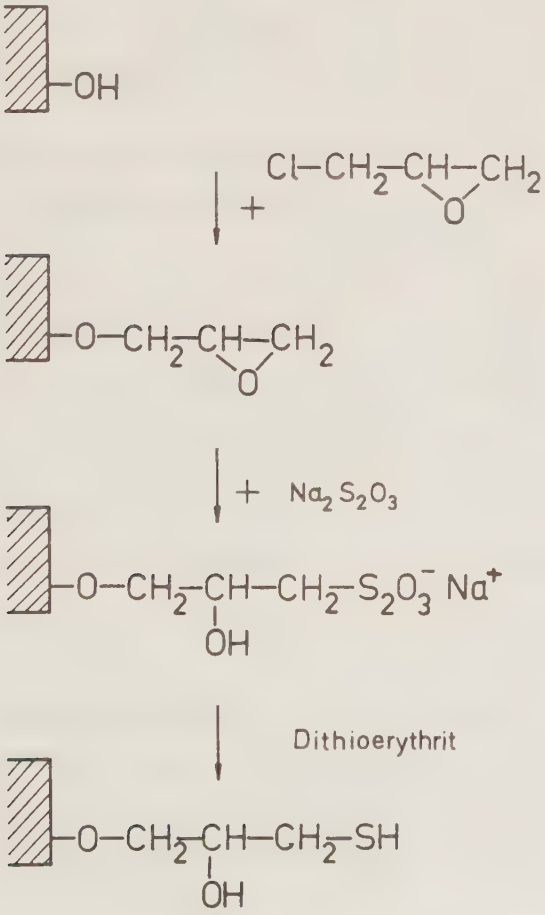
Stabilität gegenüber enzymatischer und mikrobieller Zersetzung

Hydrophiler Charakter

Daraus folgt, daß die als Trägermaterial in Frage kommenden Verbindungen auf einen kleinen Kreis reduziert sind. Aufgrund angestellter Versuche mit Glas (5,6), Polyacrylamiden (7,8), Cellulose (9,13) und Agarose-Derivaten wurde perlierte Agarose als nahezu idealer fester Träger für biospezifische Adsorptionen identifiziert (14).
Die idealen Eigenschaften der Sepharose hängen einmal mit ihrer offenporigen Struktur zusammen, die auch größeren Molekülen den Zutritt zum ungelösten Liganden erlaubt, zum anderen mit ihrem Reinheitsgrad, der eine unspezifische Trennung durch Adsorptionseffekte ausschließt (4,15).

Durch Kreuzvernetzung, die sowohl mit Divinylsulfon vorgenommen werden kann als auch bei der Aktivierung des Gels mit Bromcyan, Bisoxiran und Epichlorhydrin auftritt, kann die Härte der Sepharosepartikel gesteigert werden (16,17,18). Größere Härte des Trägermaterials ist in Bezug auf die Fließeigenschaften wünschenswert, jedoch geht mit höherer Vernetzung eine Verkleinerung der Porositäten konform, was aber bis zu einem gewissen Grade toleriert werden kann (4).
Die Hydroxylgruppen der Sepharose können nach Zwischenschaltung einer bifunktionellen Gruppe einen Liganden kovalent binden. Die bifunktionelle Gruppe, die in einem als Gelaktivierung bezeichneten Reaktionsschritt mit der Agarose reagiert, kann entsprechend der chemischen Reaktivität des Liganden, eine kovalente Bindung auszubilden,

ausgewählt werden. Einige bekannte Methoden der Aktivierung sind die mit Bromcyan, Bisoxiran und Divinylsulfon (4,16,17,18). Die von Axén et al 1975 angegebene Methode zur Herstellung einer Thiolgruppen enthaltenden Sepharose bedient sich der Aktivierung mit Epichlorhydrin (18). Der Reaktionsmechanismus läuft wie folgt ab:



Die Tatsache, daß Sulfhydrylgruppen schon unter relativ milden Bedingungen eine Vielzahl chemisch reaktiver Bindungen ausbilden können, läßt eine derartige Aktivierung der Sepharose als vorteilhaft erscheinen.
Der hier synchron mit der Aktivierung erfolgende Einbau einer hydrophilen Alkylkette, Spacer genannt, zwischen Träger und dem zu immobilisierenden Coenzym (Liganden) gewährleistet eine größere Beweglichkeit des Liganden und vermindert die sterischen Wechselwirkungen zwischen diesem und dem Träger (19,20).
Von Vorteil ist auch der hydrophile Charakter des Spacerarmes, denn hydrophobe Spacerarme können ebenso wie geladene Gruppen auf der Matrix, die eine Ionenaustauschbindung verursachen, für das Zustandekommen nicht-biospezifischer Adsorptionen verantwortlich sein (21,22).
Ein Spacerarm ist immer dann erwünscht, wenn nur geringe Affinität zwischen den beiden Komponenten des affinitätschromatographischen Systems besteht oder ein hohes Molekulargewicht des Proteins vorliegt (3). Unter geringer Affinität ist in diesem Zusammenhang eine Dissoziationskonstante oder Inhibitorkonstante von 4 mMol und größer zu verstehen.

Große Bedeutung hat die Affinitätschromatographie unter anderem bei der Reinigung und Trennung von Enzymen erlangt. Sie wurde in einer großen Anzahl von Versuchen speziell mit Sepharose als Trägermatrix angewandt (23-37).

Liganden bei Dehydrogenasen

Eine besondere Gruppe von Enzymen stellen die NAD-abhängigen Dehydrogenasen dar. Es sind hochmolekulare Proteine, sogenannte Oxidoreduktasen, die zur Ausübung ihrer katalytischen Funktion der Anwesenheit des Coenzyms Nicotinamid-adenindinucleotid bedürfen. Sie kommen in jedem Organismus vor. Zu ihrer Trennung und Reinigung sowie zur Erforschung der Enzym-Coenzym-Bindung gegenüber in verschiedener Weise modifizierten Liganden wird in zunehmendem Maße die Affinitätschromatographie angewandt.
Als Liganden wurden bisher bei den meisten Versuchen zur Herstellung eines Affinitätssorbens für NAD-abhängige Dehydrogenasen die NAD-Bruchstücke AMP und ADP (28-32), sowie NAD selbst (26,33,34) als biospezifisches Material unter Zwischenschaltung eines Spacers auf Sepharose immobilisiert. In der Mehrzahl der Fälle erfolgte die Bindung des Liganden an die Matrix am .deninteil, der entweder über das Stickstoffatom 6 (24,26,32) oder das Kohlenstoffatom 8 (35,36) mit der Matrix verknüpft wurde. Immobilisierungen des Liganden über den Riboseteil sind auch bekannt (37).
Von den über das Stickstoffatom 6 an die Matrix immobilisierten Coenzymen oder Coenzymbruchstücken zeigten besonders die N^6-(6-Aminohexyl) AMP - Agarose, N^6 -(6-Amino - hexyl)-NAD - Sepharose und die NAD-N^6-[N-(6-Aminohexyl)acetamid]-Sepharose große Affinität zu einigen Dehydrogenasen. Es gelang zum Beispiel, die Enzyme GAPDH, LDH und ADH an diese Säulen reversibel zu binden sowie GAPDH von LDH

und ADH von LDH zu trennen und H_4LDH gereinigt aus einem Rohextrakt zu gewinnen (24,38).

Elution

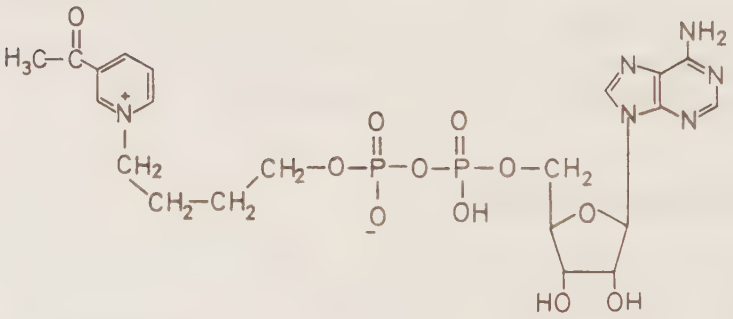
Der Nachteil einer aus allzu großer Affinität resultierenden Bindung ist, daß die Ablösung des spezifisch gebundenen Enzyms nicht auf ökonomische Art mit einer Salzlösung linear steigender Konzentration erreicht werden kann, sondern hier reines Coenzym wie zum Beispiel NAD oder ein kompetitiver Inhibitor dem Elutionspuffer zugesetzt werden müssen, um Desorption von der Matrix zu bewirken. Dieses Elutionsverfahren ist insofern aufwendiger, da - bevor mit dem Eluat enzymkinetische Messungen durchgeführt werden können - ein zusätzlicher Reinigungsschritt in Form von Gelfiltration oder Dialyse nötig ist (39).
Laut Dean (39) nimmt die Affinität des zu adsorbierenden Enzyms in dem Maße ab, in dem sich der modifizierte Cofaktor in seiner Struktur von dem natürlichen Coenzym unterscheidet.
Coenzymanaloge, die in ihrer Struktur durch Substitution der Ribofuranose-Ringe des funktionellen oder nichtfunktionellen Molekülteils mit Alkylketten modifiziert waren, sind von NAD und APNAD bekannt (40-44,46). Sie haben unter anderem Anwendung gefunden als Affinitätsreagenzien zur Untersuchung des aktiven Zentrums von Dehydrogenasen. Über ihre Eignung als Liganden in der Affinitätschromatographie ist bis jetzt weniger bekannt.

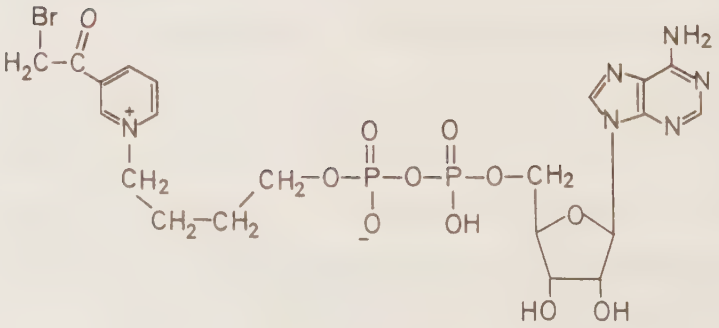
Das [Nicotinamid-ribofuranosyl]-[ω-(adenin-9-yl)n-alkyl]- pyrophosphat, bei dem die Ribose des Adeninteils durch eine Propylkette substituiert war, zeigte sich in chromatographischen Versuchen als biospezifischer Ligand wirksam (45). Die am Stickstoffatom 6 des Adeninringes über eine als Spacer fungierende Hexamethylengruppe an der bromcyanaktivierten Sepharose 4B immobilisierte Verbindung adsorbierte selektiv GAPDH aus einem Fremdprotein-GAPDH-Gemisch. Aufgrund des durch die Strukturänderung bedingten stärker dissoziierten Komplexes zwischen Coenzymanalogon und GAPDH gelang die Elution der GAPDH von der Säule mit einem Salzgradienten.

Problem und Aufgabenstellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, das NAD-Analoge [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophospat auf seine Eignung als Ligand in der Affinitätschromatographie NAD-abhängiger Dehydrogenasen zu untersuchen.
Der Ligand sollte über die Acetylgruppe des funktionellen Teils kovalent am Trägermaterial gebunden werden.
Des weiteren sollte die Bindungskapazität der Matrix für das Coenzymanalogon bestimmt und versucht werden, eine Trennung der NAD-abhängigen Dehydrogenasen LDH, GAPDH, L-ADH, H-ADH von Fremdproteinen unter Elution mit Puffer oder einem Salzgradienten zu erreichen.
Diese Verbindung hatte sich im Test mit den Enzymen LDH, ADH_L, GAPDH und ADH_H wirksam erwiesen als schwacher

Wasserstoffakzeptor und Wasserstoffdonator (46).
Als fester Träger sollte Thiopropyl-Sepharose 6B ausprobiert werden, die - wie oben beschrieben - einen hydrophilen Spacerarm besitzt, dessen Sulfhydrylgruppen die Kopplung des Coenzymanalogen an die Agarose gestatten sollten, und zwar über den funktionellen Molekülteil nach dessen Überführung ins α-Halogenketon-Derivat.





Allgemeiner Teil

Aktivierung des Liganden

An der nach der Methode von Jeck (41) synthetisierten und für diese Arbeit zur Herstellung eines Affinitätssorbens als Ligand ausgewählten Verbindung [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]adenosin-pyrophosphat wird durch Bromierung des Kohlenstoffatoms der α-Methylgruppe in Nachbarstellung zur Ketogruppe eine reaktive Stelle geschaffen, die es erlaubt das Coenzymanalogon durch Substitution an dieser Stelle an der Matrix zu immobilisieren.

Die Halogenierung mit elementarem Brom zum α-Halogenketonderivat geschieht in wässriger Brom-Wasserstofflösung, in der das aufgelöste Analoge und elementares Brom enthalten sind (43).

Die anfänglich orange-rot gefärbte Lösung entfärbt sich nach 20-stündigem Bestrahlen mit einer Shandonlampe. Überschüssiges Brom färbt nach beendeter Reaktion die klare Mischung leicht gelblich. Zusammen mit dem Bromwasserstoff entfernt man es durch mehrmalige Extraktion mit absolutem Äther. Aus der eisgekühlten wässrigen Phase kristallisiert nach Zugabe von eiskaltem Aceton das Bromacethylderivat aus, dessen Fällung bei niedriger Temperatur vervollständigt wird.

Nach Entfernung des Fällungsmittels wird der Niederschlag im Vacuum getrocknet und bis zur Verwendung in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Diese Bromacetylderivate stellen sehr instabile Verbindungen dar und sind auch bei minus 20 Grad nur kurze Zeit lagerungsfähig. Wir haben die Verbindung unmittelbar vor Kopplung an das Gel synthetisiert.

Vorbehandlung und Reduktion der Matrix

Gefriergetrocknete Thiopropyl-Sepharose 6B wird in dem vom Hersteller angegebenen Verhältnis mit Phosphatpufferlösung von neutralem pH versetzt und im Erlenmeyerkolben die vorgeschriebene Zeit quellen lassen (47).
Hierbei gehen die zur Konservierung der Quelleigenschaften der Sepharose beigegebenen niedermolekularen additiven Substanzen in Lösung, während gleichzeitig das Gel aufquillt, wobei ein Gramm Gel ein Volumen von 3 ml einnimmt. Anschließend wird das Gel über einer Glasfritte abgenutscht und die niedermolekularen Bestandteile durch mehrmaliges Waschen mit der genannten Pufferlösung ausgespült.
Die Notwendigkeit der Reduktion der in obiger Weise behandelten Thiopropyl-Sepharose 6B, die in diesem Fall in einem alkalischen Milieu mit Dithioerythrit vorgenommen wurde, ergibt sich aus folgendem:
Die Thiopropyl-Sepharose 6B besteht aus einem polymeren Grundgerüst, aufgebaut aus den monomeren Bausteinen D-Galactose und 3-6 Anhydro L-Galactose (47), an das hydrophile 2-Hydroxypropylgruppen über chemisch stabile Ätherbindungen gebunden sind. Diese als Spacergruppen fungie-

rende Moleküle können über eine endständige reaktive Thiolgruppe einen geeigneten Liganden chemisch binden.

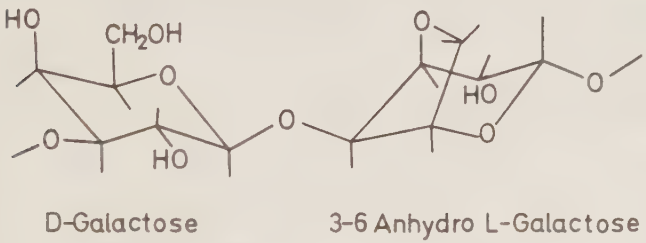
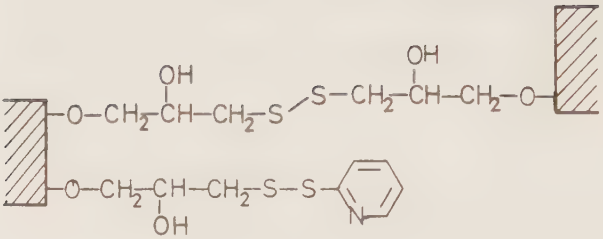
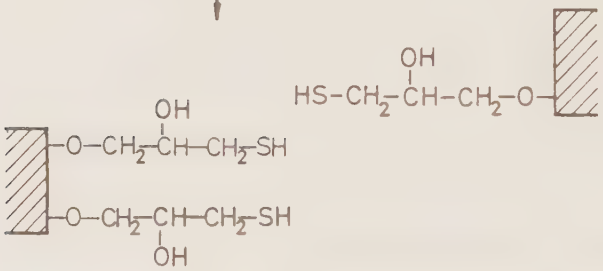


Abb. 3: Ausschnitt aus Agarose-Molekül

In der Thiopropyl-Sepharose sind die Sulfhydrylgruppen mit 2-Thiopyridon substituiert, das in unserem Fall vor der Kopplung des Coenzymanalogon durch Dithioerythrit-Reduktion abgespalten wurde (18,48). Durch die Reduktion werden außerdem im Gel vorhandene Disulfidbrücken gespalten, so daß der Gehalt an reaktiven Sulfhydrylgruppen nach der Reduktion 35 µMol pro ml Gel beträgt gegenüber 20 µMol 2-Thiopyridonschutzgruppen pro Milliliter Gel vor der Reduktion (49,50).
Nach gelegentlichem vorsichtigen Schütteln innerhalb einer dreiviertelstündigen Reaktionszeit wird das reduzierte Gel von der Lösung abfiltriert und gründlich mit verdünnter Essigsäurelösung gewaschen, anschließend in Ameisensäure-Eisessigpuffer äquilibriert.



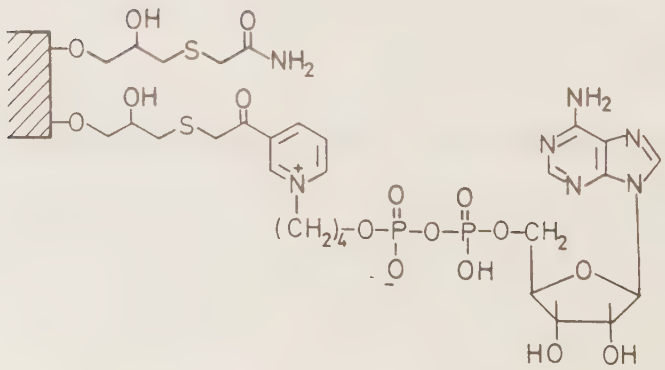
+ Dithioerythrit



1) [4-(3-Bromacethylpyridinio) butyl] -adenosin-pyrophosphat

+

2) Jodacetamid



Kopplungsschritt

Die unmittelbar vorher frisch synthetisierte NAD-analoge Verbindung [4-(3-Bromacetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat (41,43) wird aufgelöst in Ameisensäure-Eisessig der im Reaktionsgefäß befindlichen Gelsuspension beigefügt. Zwei Tage lang besorgt eine Rüttelmaschine eine intensive Durchmischung der beiden Reaktionsphasen. Freie SH-Gruppen, die sich innerhalb der vorgenannten Reaktionszeit nicht mit Reagenz umsetzen, werden nach Überführung des abgetrennten Gels in Phosphatpufferlösung von neutralem pH mit im Überschuß beigegebenen Jodacetamid blockiert (47).
Der Grund dieser Maßnahme ist einmal die Verhinderung einer mit Aktivitätsverlust verbundenen Fixierung von Enzymen an freie Thiolgruppen der Sepharose und zum anderen die Unterbindung der Oxidation von Sulfhydrylgruppen zu anionischen Sulfonsäuregruppen, wodurch ionische Wechselwirkungen zwischen Gelmatrix und Proteinen provoziert werden, die bei der Affinitätschromatographie aber unerwünscht sind. Durch sie wird eine spezifische Adsorption aufgehoben oder verfälscht (51,52).

Ligandenkonzentration - Theoretische Überlegungen und Bestimmungsmethoden

Wie aus theoretischen Ableitungen bekannt, ist der maximal erreichbare Prozentsatz gebundenen Enzyms abhängig

von der Dissoziationskonstanten des Enzym-Coenzym-(Ligand)-Komplexes und der Ligandenkonzentration. Da aus thermodynamischen Überlegungen nur 1 Prozent oder weniger der aufgegebenen Ligandenkonzentrationen als enzymbindende Komponenten wirken können, sollte das Verhältnis der Molzahlen Enzym zu Ligand 1 : 100 oder kleiner sein (53). Daher erschien es notwendig, die Kapazität des Affinitätssorbens zu ermitteln, d.h. die Bestimmung der im Milliliter Gel gebundenen µMol Ligand, wodurch gleichzeitig die Effektivität der Kupplungsreaktion überprüft wird.
Eine Methode hierzu ist die photometrische Messung der Extinktionen des Coenzymanalogen, ein anderer Weg führt über die quantitative Bestimmung des Phosphatgehaltes des Gels (54).

Bestimmung der Ligandenkonzentration

Als Analogon besitzt [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosindiphosphat ähnliche optische Eigenschaften wie NAD (46). Die oxidierte Form von NAD zeigt ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 260 nm, das durch den Adenin- und Nicotinamidring bedingt ist. Bei Übergang in die reduzierte Form nimmt dieses Maximum ab, während gleichzeitig eine neue Absorptionsbande bei 340 nm auftritt als Ausdruck der Reduktion des der Wasserstoffübertragung dienenden Nicotinamidteils von NAD (55,56) zum Dihydronicotinamid. Cyanid-

ionen bilden mit NAD^+ durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Kohlenstoffatom 4 (= C4) des Pyridinringes eine als Cyanidaddukt beschriebene Verbindung mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 327 nm (60). Das gleiche spektrale Verhalten zeigt das Coenzymanalogon, wobei die entsprechenden Absorptionsmaxima des Dihydropyridinringes und der Cyanidkomplexverbindung nach längeren Wellenlängen verschoben sind (46). Extinktionskoeffizienten wurden von Jeck bestimmt (46).

	oxidierte Form	reduzierte Form	Cyanid-Addukt
λ_{Max} (nm)	259	382	361
$\varepsilon \cdot 10^{-3}$ ($cm^{-1}M^{-1}$)	17,2	10,6	9,5
pH	9,5	9,5	12,5

Die Messung des UV-Spektrums des auf Sepharose immobilisierten Coenzymanalogons und seines Cyanidadduktes ergab Absorptionsmaxima, die denen des freien identisch sind. Unter Zugrundelegung der molaren Extinktionskoeffizienten für das freie Analogon wurde daher der Gehalt des Gels an gebundenem Liganden näherungsweise aus der gemessenen Extinktion bei den Wellenlängen 259 nm oder 361 nm bestimmt. Extinktionsmessung in 0,02 cm Küvetten erfolgte für das oxidierte Analogon mit 1 : 1 mit Pufferlösung verdünntem Gel gegen reine Pufferlösung, für den Cyanid-

komplex mit 1 : 1 mit Kaliumcyanidlösung verdünntem Gel gegen in gleichem Verhältnis verdünnter Kaliumcyanidlösung. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet sich daraus die Konzentration des gebundenen Liganden

$$c = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d} \cdot k$$

Dabei bedeuten:

c = Konzentration Mol/l

d = Lichtweg in cm

ε = molarer Extinktionskoeffizient cm^{-1}. $Molar^{-1}$

k = Verdünnungsfaktor

Die so erhaltenen Werte:

für Gel I = 5 μ Mol Ligand/ml Gel

für Gel II = 8 μ Mol Ligand/ml Gel

stimmten mit den durch Phosphatbestimmung ermittelten Ligandenkonzentrationen überein.

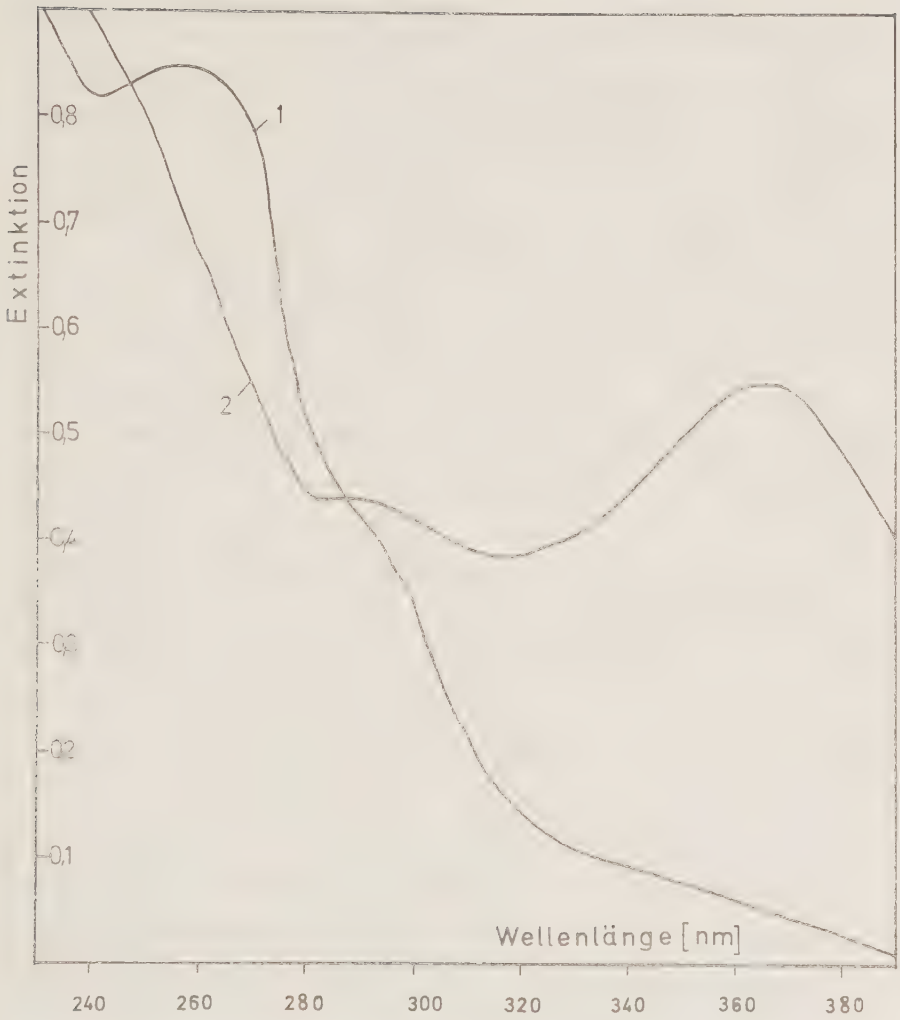


Abb. 5: UV-Spektrum und Cyanid-Spektrum des immobilisierten [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat Gel I

1) UV-Spektrum 2) Spektrum des Cyanidadduktes

0,02 cm Quarzküvetten

Abb. 6: UV-Spektrum des immobilisierten [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat

UV-Spektrum Gel II 0,02 cm Quarzküvetten

Vor Bestimmung des Phosphatgehaltes ist die Überführung des organisch gebundenen Phosphats in anorganisches Orthophosphat sowie Hydrolyse und Oxidation der Agarpolysaccharide notwendig. Eine von Martland und Robison angegebene Methode, die eine genaue Extinktionsmessung erlaubt, beruht auf der Tatsache, daß Orthophosphat mit Ammoniummolybdat eine Heteropolysäure bildet, die in Saurem mit Sulfit aufgrund der Reduktion zu Molybdänblau eine gefärbte Lösung ergibt (54,57,58).

Die Extinktion (des Absorptionsmaximums) bei 578 nm ist dabei unter den Versuchsbedingungen dem Gehalt an Orthophosphat proportional (54).

Der lineare Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration an Orthophosphat kann graphisch durch eine empirisch gewonnene Eichkurve dargestellt werden.

Als Eichlösungen fanden Verwendung:

Natriumdihydrogenphosphat - Dihydrat

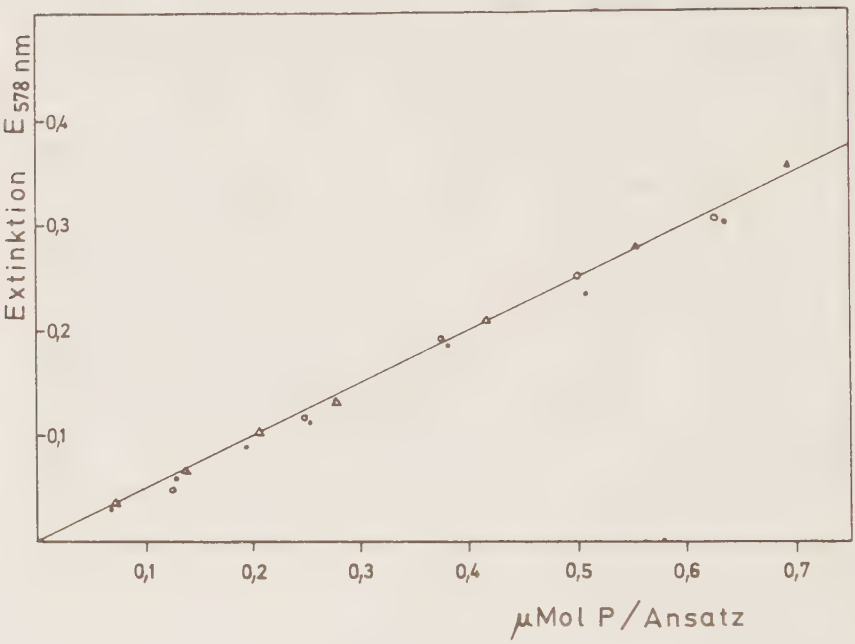
Kaliumhydrogenphosphat

Dinatriumsalz von Adenosin 5' Monophosphat.

Der bekannte Phosphatgehalt der Proben variierte zwischen 0,005 mg und 0,07 mg Phosphat, die gemessenen zugehörigen Extinktionen zwischen 0,025 und 0,33. Die so ermittelte Eichgerade erlaubt die Bestimmung des Phosphatgehaltes von Lösungen unbekannter Konzentration. Aus der Steigung ergibt sich, daß der Phosphatgehalt einer Probe in μMol zahlenmäßig dem zweifachen Wert der gemessenen Extinktionsdifferenz entspricht.

$$\mu\text{Mol Phosphat pro Probe} = 2 \cdot \Delta E_{578}$$

Abb. 7 : Eichkurve der Phosphatbestimmung



Die Eichpunkte wurden gewonnen mit:

• : K_2HPO_4 (12,716 mM)

△ : $Na_HH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$ (13,837 mM)

○ : AMP-Dinatriumsalz (1,25 mM)

Untersuchung des Trennverhaltens

An Gemischen aus Rinderserumalbumin, LDH, GAPDH, ADH_H und ADH_L wurde das Trennverhalten des in eine Chromatographische Säule gefüllten Affinitätssorbens untersucht. Die Länge der Säule betrug 215 mm, der Durchmesser 5,6 mm, der Gehalt des Gels an Dinucleotid war 5,0 µMol/ml. Vor Auftragen auf die Trägersäule wurden die Proteine dreimal zwei Stunden gegen das bei der Affinitätschromatographie einzusetzende Fließmittel dialysiert.
Nach Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität und des Proteingehaltes der dialysierten Eiweiße wurde die Säule jeweils mit einer kleinen Probe aus Rinderserumalbumin und einer Dehydrogenase beschickt. Das Probevolumen lag zwischen 150 bis 300 µl, sein Eiweißgehalt überstieg im allgemeinen nicht 2 mg.
Nach einigen Milliliitern Durchfluß erschien als erstes Rinderserumalbumin im Eluat, was aufgrund der fehlenden biologischen Affinität zum Dinucleotidanalogon vorauszusehen war. Es gelang aber auch, im gleichen Eluat LDH, ADH (Leber) und ADH (Hefe) nachzuweisen. Die Elution von GAPDH erfolgte ohne Änderung des Elutionspuffers verzögert und ließ eine deutliche Trennung des Serumeiweißes vom Enzym erkennen.
Die vollständige Ablösung der Proteine wurde durch Spülung mit NAD^+ bzw. AMP und anschließend 6 m Harnstofflösung kontrolliert.

Aus den vorangegangenen Versuchsergebnissen ergab sich der Ansatz, eine bessere Trennung der Enzyme LDH, ADH_L und ADH_H vom coenzymunspezifischen Serumalbumin durch Einsatz längerer Säulen und Reduktion der Fließgeschwindigkeit zu erreichen. Weitere Überlegungen gingen dahin, die Bindungskapazität des Sorbens durch eine Erhöhung der Ligandenkonzentration zu verbessern.
In Durchführung der Kopplungsreaktion im Essigsäure-Acetatpuffer, wobei [4-(3-Bromacetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat im Überschuß eingesetzt wurde, gelang es - wie vorher beschrieben - die Ausbeute der Kopplungsreaktion zu erhöhen und 8,0 $\pm$ 0,3 µMol Coenzymanalogon pro ml Gel am Trägermaterial zu immobilisieren.

Trennversuch an aufgezogenem [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat an Sepharose 6B
Chromatographiesäule: 33 cm x 0,56 cm Ø

Auch unter den so veränderten Versuchsbedingungen wurde coenzymunspezifisches Serumprotein im Eluat nach einigen Millilitern erhalten. Es bestätigte sich jedoch die Vermutung, daß sich die Voraussetzungen zur spezifischen Komplexbildung zwischen Dehydrogenasen und unlöslichem Coenzymanalogen durch Verlängerung der Trennstrecke und Äquilibrierzeit optimieren ließen.
Die deutlichste und vollständigste Trennung von Fremdproteinen an dieser Säule zeigte ADH_L. Das Enzym wurde selektiv adsorbiert, Desorption konnte mit Elutionspuffer nicht

erreicht werden. Die vollständige Elution gelang erst mit einem NaCl-Gradienten linear steigender Ionenstärke bei 0,19 molar. Als Ausdruck scharfer Trennung konnten 78 % der aufgebrachten Enzymaktivität in kompakter Fraktionierung in ca. 7 ml Eluat nachgewiesen werden.
Für LDH ergab sich im unspezifischen Protein-Eluat nur eine minimale enzymatische Aktivität. Weniger als die Hälfte an Enzym konnte zunächst in großem Volumen verzögert mit Puffer eluiert werden, während die restlichen 50 Prozent nur nach Aufgabe eines Salzgradienten im Eluat von 30 ml aufgefangen wurden.
Verwendung von NAD^+ und 6 m Harnstofflösung als Elutionsmittel zeigte, daß vollständige Ablösung sowohl im Falle der Alkohol-Dehydrogenase (Leber) als auch der Lactat-Dehydrogenase erfolgt war.
Aufgrund einer offenbar nur schwachen Bindung tritt bei ADH_H in begrenztem Bereich Überlappung der Albumin und Enzym enthaltenden Fraktionen ein. Die Maxima der Enzymaktivität und die der UV-Absorption bei 280 nm sind nur ca. 15 ml gegeneinander verschoben. Circa 8 % der enzymatischen Aktivität wurden im nicht spezifischgebundenen Serumeiweiß registriert. Die durch Elutionspuffer vom Gel mit Verzögerung abgelöste ADH_H wurde in einem Volumen von ca. 94 ml identifiziert. Initial ließ sich maximale Enzymaktivität nachweisen, die kontinuierlich über die folgenden Fraktionen abklang. Ein kleiner Rest an ADH_H wurde durch Zusatz von Natriumchlorid zum Elutionspuffer von der Säule eluiert.

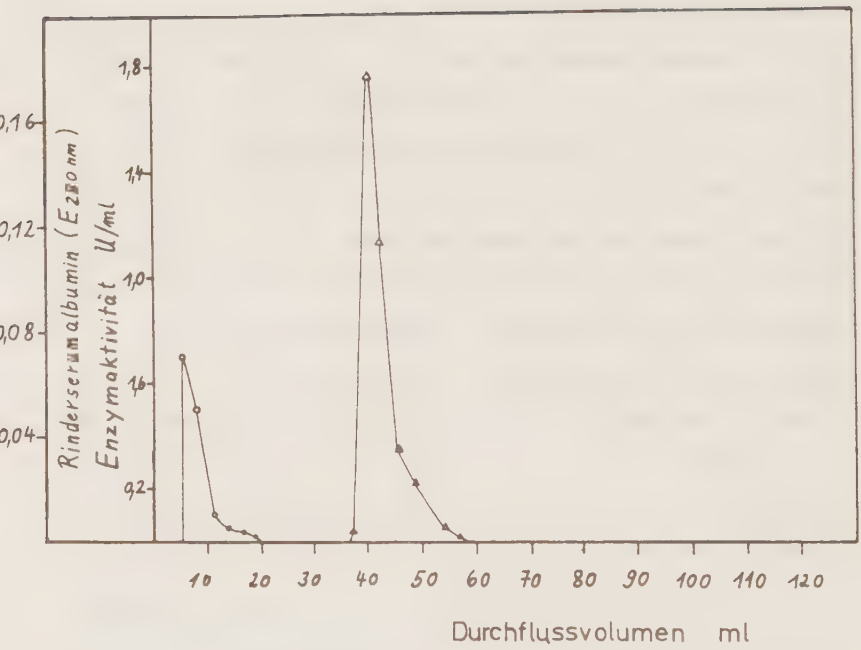


Abb. 8: Chromatographie von Albumin und GAPDH an kovalent an Thiopropyl-Sepharose fixiertem [4-(3-Acetylpyridinio) butyl]-adenosin-pyrophosphat. Aufgetragen wurde eine Probe (300 µl) von 0,66 mg Albumin und 0,6 mg GAPDH (42 U). -o-o-o- Albumin, -Δ-Δ-Δ-GAPDH. Tropfgeschwindigkeit: 14 ml/h, Fraktionen: 2,8 ml. Elutionspuffer: 0,01 m Natriumphosphatpuffer pH 7.

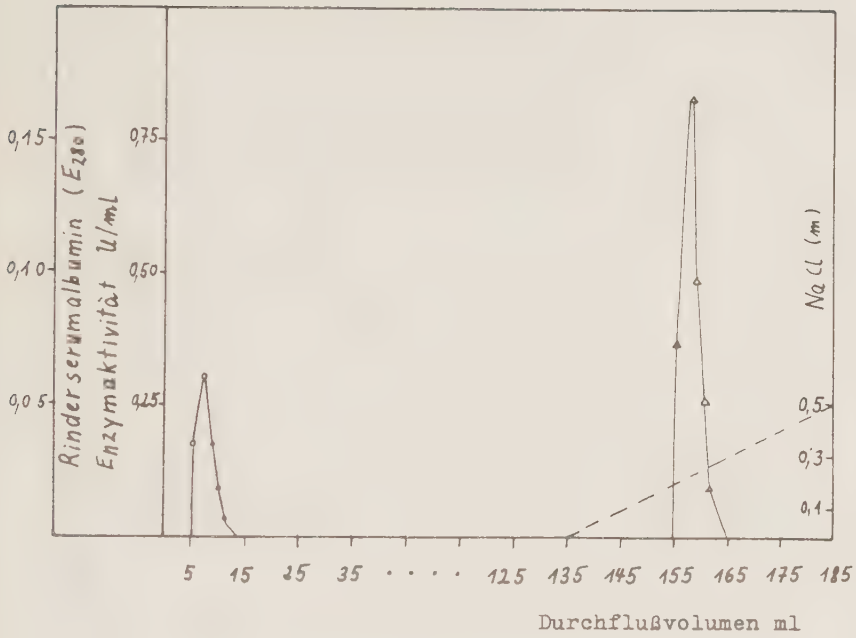
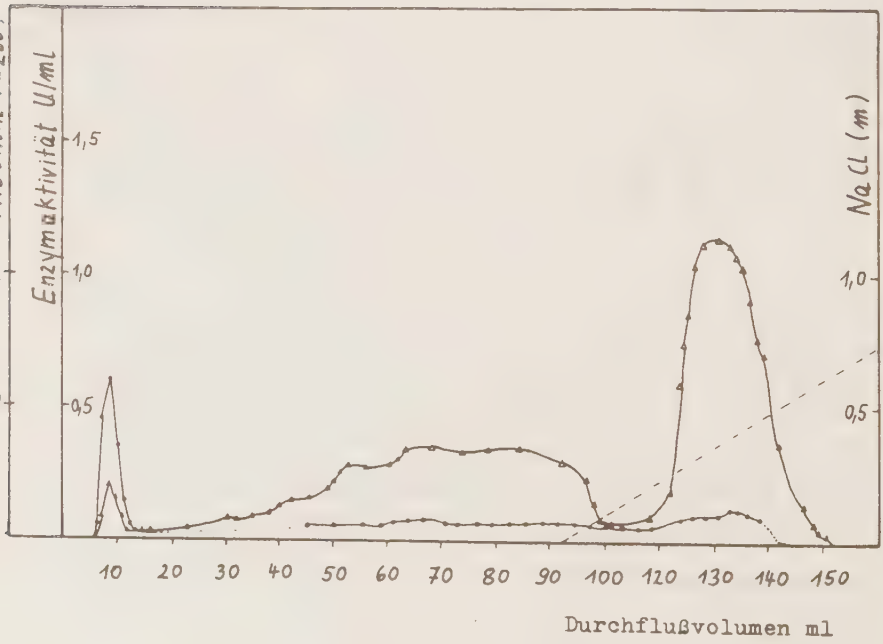


Abb. 9: Chromatographie von Rinderserum-Albumin und ADH_L an kovalent an Sepharose gebundenem Coenzymanalogon. Es wurde eine Probe (300 µl) von 0,53 mg Rinderserumalbumin und 0,9 mg ADH_L (3,65 U) aufgetragen. Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten: 0 - 2 m (Gesamtvolumen 200 ml) Rinderserumalbumin -o-o-o- , ADH_L -△-△-, Fraktionen: 1,4 ml, Tropfgeschwindigkeit: 7 ml/h.

Abb. 10: Chromatographie von Rinderserumalbumin und LDH an immobilisiertem Dinucleotid-Analogon. Es wurde eine Mischung aus 0,71 mg Rinderserumalbumin und 0,92 mg LDH (43 U), gelöst in 250 µl 0,01 m Natriumphosphatpuffer pH 7, aufgetragen. NaCl-Gradient: 0 - 1 m (Gesamtvolumen 80 ml) Tropfgeschwindigkeit: 5,25 ml/h, Fraktionen: 1,5 ml. -△-△- LDH, -○-○-○- $E_{280\ nm}$.



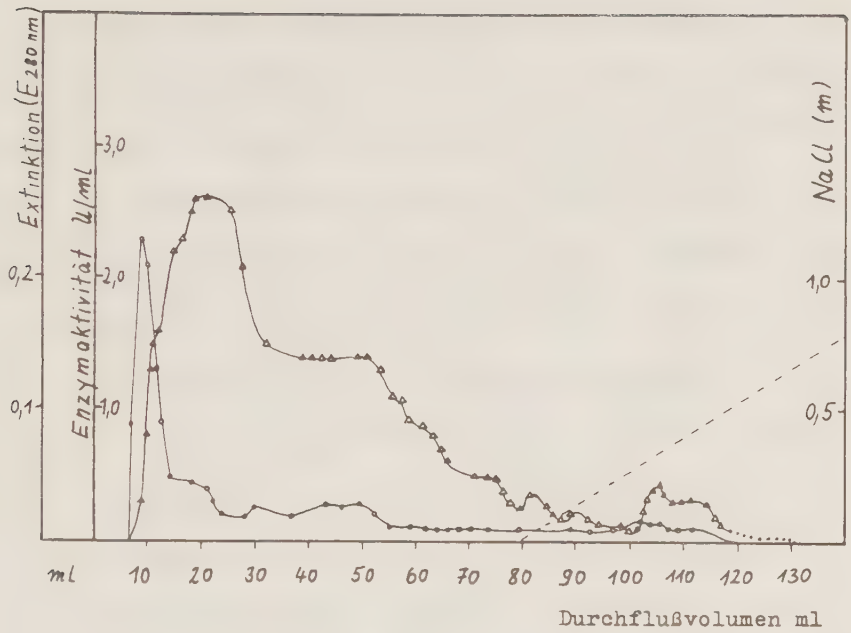


Abb. 11: Chromatographie von ADH_H und Rinderserumalbumin an immobilisiertem Coenzymanalogon. Es wurden 0,79 mg ADH_H (144 U) und 0,66 mg Albumin, gelöst in 150 µl Chromatographiepuffer, aufgetragen. ○-○-○ $E_{280\,nm}$, △-△-△ ADH_H. Fraktionen: 0,8 ml, Tropfgeschwindigkeit: 4 ml/h. Elutionspuffer: 0,01 Natriumphosphatpuffer pH 7. NaCl - Gradient: 0 - 2 m (Gesamtvolumen 160 ml).

Diskussion

Das bromierte Coenzymanalogon zeigt sich nach kovalenter Verknüpfung an Thiopropyl-Sepharose als Affinitätschromatographie-Ligand für NAD-abhängige Dehydrogenasen wirksam. ADH_L und GAPDH werden vom Trägermaterial spezifisch gebunden, während es sich bei LDH zum Teil um eine spezifische, zum Teil um eine unspezifische Adsorption handelt. ADH_H wird nur schwach fixiert und von Puffer niedriger Ionenstärke eluiert. Berücksichtigt man, daß pro 1 ml Gel 8 µMol Coenzym gebunden sind, so sollte man erwarten, daß alles Enzym in der Größenordnung von 10 nMol an die Säule fixiert wird. Im Falle von ADH_H und LDH stellt man fest, daß ein Teil ohne Salzzugabe eluiert wird. Diese Beobachtung erklärt sich aus unterschiedlicher Bindung des Coenzyms am Träger und aus der schwächeren Adsorption von Enzym am trägergebundenen Coenzym. Der Pyridiniumteil des Coenzyms kann nicht mit dem Enzym Komplexe ausbilden, da hier die Bindung an die Thiopropyl-Sepharose erfolgt ist.

Von ADH_L ist bekannt, daß die Verknüpfungsstelle am AMP-Teil lokalisiert ist (61). Man sollte eine Komplexbildung zwischen Enzym und Ligand dann erwarten können, wenn die Bindungsstellen, und zwar die hydrophobe Tasche zur Fixierung des Purinringes, die Asparagingruppe 223 für die 2' Hydroxylgruppe der Adenosinribose und der Argininrest 47 zur Bindung der Pyrophosphat-

gruppe für das immobilisierte Coenzymanalogon erreichbar sind.

Die Immobilisierung des Liganden über die Acetylgruppe des Pyridinringes schuf für ADH_L günstige Voraussetzungen, mit dem AMP-Teil des Coenzymanalogon in Wechselwirkung treten zu können. Das Ergebnis, eine spezifische Bindung des Enzyms an das Trägermaterial und ökonomische Elution mit einem Salzgradienten, bestätigt die Bedeutung dieses Molekülteils für die Bindung des Enzyms.

Die Bedeutung des Ribofuranoseringes des NMN-Teils von NAD für die Stabilität der GAPDH-Coenzym-Bindung ergibt sich aus kinetischen Messungen der Inhibitorkonstanten von ADP und ADP-Ribose (ADP = 2,9 mM, ADP-Ribose = 0,18 mM) und einem Vergleich der Dissoziationskonstanten unseres Analogons mit NAD (0,58 mM = K_D Analogon, 0,035 mM = K_D-NAD) (62,63). Deshalb hat der Ersatz der Ribofuranose durch eine Butylgruppe in unserem Liganden einen stärker dissoziierten Enzym-Coenzym-Komplex zur Folge, der daher eine chromatographische Trennung der GAPDH von Fremdproteinen ohne Zusatz eines Kofaktors zum Elutionspuffer erlaubte.

Das Elutionsdiagramm der LDH zeigt, daß Affinität zwischen dem trägergebundenen Liganden und LDH besteht, die aber nur teilweise in spezifischer Adsorption manifestiert ist.

Wie mehrere Autoren anhand durchgeführter kinetischer und strukturanalytischer Untersuchungen sowie thermody-

namischer Messungen mit NAD-Bruchstücken und NAD-Analogen zeigen konnten, spielt das Purinringsystem für das Zustandekommen der Bindung zwischen Coenzym und LDH eine wichtige Rolle, wobei die Intensität der Komplexbildung in dem Maße zunimmt, in der das Fragment vom Adeninring her aufbauend dem AMP ähnlicher wird (64,65).

Am unproblematischsten dürfte sich eine Komplexierung zwischen an der Oberfläche der Gelperlen fixiertem Liganden und affinem Enzym gestalten, da hier die Wahrscheinlichkeit am größten ist, in Wechselwirkung mit den reaktiven Stellen des immobilisierten Coenzyms treten zu können. Die weiteren Möglichkeiten, feste Bindungen einzugehen, hängen unter anderem von der Lokalisation des Liganden am Trägermaterial, seiner Konformation und der Lokalisation der Verknüpfungsstellen im Netzwerk der Matrix ab. Es ist durchaus denkbar, daß ein Teil der Ligandenmoleküle, die infolge der offenporigen Struktur der Sepharose in der Tiefe von Spalträumen oder Buchten immobilisiert wurden, in ihren Möglichkeiten mit Aminosäureseitenresten der LDH zu reagieren eingeengt sind. Man kann daher nicht erwarten, daß unter diesen sterischen Zwängen eine korrekte Anlagerung des Enzyms an den Liganden stattfindet. Andererseits muß angenommen werden, daß sich bei der LDH die hydrophobe Tasche, die primär zur Bindung beiträgt, im Enzym in einer solchen Distanz von der Proteinoberfläche befindet, die nur bei einer bestimmten Extension des Liganden erreicht werden kann.

Variationen in der Lokalisation des fixierten Liganden können daher zur Folge haben, daß die stärker zur Bindung beitragende Adenosinribose bezw. die eine Konformationsänderung des Enzyms und damit weitere Stabilisierung bewirkende Phosphatgruppe nicht mehr von der Coenzymbindungsstelle der LDH tangiert wird, woraus eine schwache unspezifische Bindung resultieren sollte, wie sie das Elutionsdiagramm bis zum Elutionsvolumen von 100 ml ausweist (66).

Zu bedenken ist weiterhin, daß der immobilisierte Ligand aufgrund der größeren Flexibilität der Butylkette in einer Konformation vorliegen kann, die eine Verkürzung des gesamten Moleküls bewirkt (67).

Die registrierte minimale LDH-Aktivität in den ersten Fraktionen ist wahrscheinlich auf ein Mitreißen geringer spezifischer Eiweißmengen durch das schneller wandernde Albumin zurückzuführen.

Im Falle der ADH_H erfolgte nur eine schwache unspezifische Bindung an das Affinitätssorbens. Wie aus dem Elutionsdiagramm ersichtlich, kommt es hier zu einer Überlappung der die enzymatische Aktivität und die Proteinabsorption ausweisenden Peaks.

Zusammenfassung

[4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat, eine NAD-analoge Verbindung, bei der der 3-Carbonamidrest durch eine Acetylgruppe und die N^1-gebundene Ribofuranose durch einen n-Butylrest ersetzt sind, wird mit elementarem Brom in [4-(3-Bromacetylpyridinium)butyl]-adenosin-pyrophosphat überführt. Durch Reaktion der nucleophilen Sulfhydrylgruppen der Thiopropyl-Sepharose mit der Bromacetylgruppe dieser Verbindung entsteht ein Affinitätssorbens für Dehydrogenasen. Es werden maximal 5µMol bis 8µMol Coenzymanalogon pro Milliliter feuchten Gels von dem Thioderivat der Agarose kovalent gebunden. Das Sorbens wird in Glassäulen gefüllt, äquilibriert und NAD-abhängige Dehydrogenasen daran chromatographiert. Mit diesem als Affinitätschromatographie bezeichneten Trennverfahren werden auf schonendste Weise in einem Reinigungsschritt native Enzyme von unspezifischem Eiweiß getrennt. ADH_L aus Leber wird bei niedriger Ionenstärke an dieser Säule reversibel gebunden, kann von Fremdproteinen freigewaschen und mit einem Salzgradienten eluiert werden. ADH aus Hefe und LDH aus Herzmuskel zeigen diesem Affinitätssorbens gegenüber geringere Affinität, die sich dadurch ausdrückt, daß sie mit Pufferlösung niedriger Ionenstärke stark verzögert eluiert werden, wobei für LDH zur vollständigen Ablösung eine Pufferlösung höherer Salzkonzentration erforderlich ist. Dagegen wird

Albumin bereits nach kleinem Durchflußvolumen im Eluat identifiziert.

Kovalent an Thiopropyl-Sepharose gebundenes [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat ist zu einer selektiven Adsorption von ADH_L und bedingt von LDH aus einem Proteingemisch geeignet.

Praktischer Teil

Bromierung

336 mg [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat werden in einem 100 ml Spitzkolben in 10 ml 3%igem wässrigen Bromwasserstoff gelöst. 5 ml einer 3%igen Bromwasserstofflösung, die in 10 ml 330 mg Brom gelöst enthält, werden zu dieser Lösung pipettiert und der Kolben mit einem Glasstopfen gut verschlossen. Es bildet sich sofort eine orange-rote Suspension.

Anschließend wird der Spitzkolben mit Inhalt 48 Stunden lang mit weißem Licht bestrahlt, nachts mit einer Shandonlampe 2 x 6 Watt aus 20 cm Entfernung und tagsüber zusätzlich mit Sonnenlicht.

Überschüssiges Brom und Bromwasserstoff extrahiert man [illegible] mal mit je 30 ml Äther aus der nur noch leicht gelb gefärbten Lösung. Durch Zugabe von 30 ml eiskaltem Aceton fällt das bromierte Coenzymanalogs als weißer Niederschlag aus. Über Nacht wird der Kolben bei - 20° C belassen. Hierdurch wird vollständige Fällung erreicht. Der Überstand, Aceton, wird abgenommen und der weiße Niederschlag 2 x mit je 40 ml einer Aceton-Ätherlösung im Verhältnis 2 : 1 [illegible]. Dann wird zwei Minuten lang am Rotationsverdampfer getrocknet.

Die Bromierung erfolgte analog der für das Propylderivat beschriebenen Vorschrift (43).

Reduktion der Thiopropyl-Sepharose 6B und Kopplung

5 g Thiopropyl-Sepharose 6B werden in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml 0,1 m Phosphat-Puffer pH 7, der 1 mM an Na_2 EDTA war, 15 Minuten lang gequollen. Danach wird das gequollene Gel auf einer Nutsche mit Glasfritte in 20 Minuten mit insgesamt 800 ml des gleichen Puffers gründlich gewaschen.
In einem 100 ml Schliffkolben werden 255 mg Dithioerythrit in 20 ml einer 0,3 m Natriumbicarbonat-Pufferlösung/ 1 mM EDTA pH 8,4 gelöst. Das feuchte Gel wird nun in kleinen Portionen vorsichtig in den Schliffkolben überführt und die Suspension anschließend bei Raumtemperatur 40 Minuten lang schwach geschüttelt. Danach spült man das reduzierte Gel ohne Luft durchzusaugen auf einem Glasfilter mit Nutsche mit insgesamt 2 Liter 0,1 m Essigsäure/0,5 m Natriumchlorid/1 mM Na_2 EDTA-Lösung gründlich durch.
Die so gewonnenen 15 ml feuchten Gels, die insgesamt 0,5 mVal freie SH-Gruppen enthalten, werden in ein 100 ml Rundkölbchen eingefüllt, das bromierte Coenzymanaloge, gelöst in 20 ml $CHOOH/CH_3COOH$-Puffer pH 1,9 dazugegeben und die Suspension 2 Tage lang bei Raumtemperatur mit Hilfe einer Rüttelmaschine gut durchmischt.

Blockierung freier SH-Gruppen

Das vom Reaktionsmedium abgetrennte Gel wird in 50 ml

0,1 m NaH_2PO_4-Puffer pH 7 suspendiert, der 2 g Jodacetamid gelöst enthält. Nach zweistündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wird das Gel von überschüssigem Jodacetamid befreit durch gründliches Waschen über einem Glasfilter mit ca. 800 ml 0,1 m Phosphat-Puffer pH 7. Dann äquilibriert man das Gel mit ca. 300 ml 0,01 Phospnat-Puffer pH 7, um die Ionenstärke zu reduzieren und füllt es in eine Chromatographiesäule.
Von der Hauptmenge abgetrenntes Gel, das nicht sofort für chromatographische Zwecke genutzt wird, kann für einige Zeit in CH_3COOH/CH_3COONa - Puffer pH 4 bei 4° C aufbewahrt werden (18).

Versuch zur affinitätschromatographischen Trennung von Rinderserumalbumin und GAPDH von kovalent an Thiopropyl-Sepharose 6B gebundenem [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat.

In Dialyseschläuchen werden ca. 1 ml Enzymsuspensionslösung und 2 ml Albuminlösung 3 x zwei Stunden lang gegen jeweils 1,6 l 0,01 m Phosphat-Puffer pH 7 bei 4° C dialysiert. Im Enzymdialysat wird die enzymatische Aktivität bei 25° C durch Auslösen der Redox-Reaktion zwischen GAP und NAD bestimmt (42 U/ml). Die Proteinkonzentration dialysierter Lösungen wird mit der Biuret-Methode ermittelt (59).
Eine 0,56 cm Ø x 21 cm große Säule, die 5 µMol kovalent

an Thiopropyl-Sepharose 6B gebundenes Coenzymanalogon pro ml feuchten Gels enthält, wird mit 0,01 m Phosphat-Puffer pH 7 äquilibriert. 0,66 mg Rinderserumalbumin und 0,6 mg GAPDH, in 0,3 ml Puffer gelöst, werden auf diese Säule aufgegeben. Mit 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 wird gewaschen. Es werden Fraktionen à 2,8 ml bei einer Tropfgeschwindigkeit von 14 ml/h aufgefangen. Die GAPDH -Aktivität jeder einzelnen Fraktion wird bestimmt und die Absorption des Eluats bei 280 nm registriert. 10 U GAPDH werden an dieser Säule verzögert gegenüber dem Serumeiweiß eluiert. Die Säule wird anschließend mit NaCl bis 0,4 m ,

AMP - Gradient 25 mM 300 ml

14 ml 6 m NAD - Lösung gewaschen.

Versuch zur affinitätschromatographischen Trennung von Rinderserumalbumin und ADH_L von kovalent an Thiopropyl -Sepharose 6B gebundenem [4-(3-Acetylpyridinio)butyl] -adenosin-pyrophosphat.

Circa 0,5 ml einer Kristallsuspension des Enzyms und ca. 1 ml Rinderserumalbumin werden in Dialyseschläuche gefüllt und über Nacht gegen je ca. 1,5 l 0,01 m Phosphatpuffer pH 7 bei 4° dialysiert. Für ADH_L erfolgte zusätzlich zweistündige Dialyse gegen den gleichen Puffer mit zweimaliger Wiederholung. Vom Ungelösten wird abzentrifugiert und Eiweißkonzentration und enzymati-

sche Aktivität gemessen.

Die Enzymaktivität beträgt 14,6 U/ml

Eiweißkonzentration der Enzymlösung: 3,63 mg/ml

Rinderserumalbumin-Konzentration: 10,54 mg/ml

Ein Glasrohr mit einem Durchmesser von 0,56 cm wird 33 cm hoch mit kovalent an Thiopropyl-Sepharose 6B gebundenem Coenzymanalogen gefüllt, dessen Konzentration 9 µMol pro ml feuchten Gels beträgt. Nach Äquilibrierung mit 0,01 m Phosphatpuffer pH 7 bei 4° C werden an dieser Säule 0,33 mg Albumin und 3,67 U ADH_L chromatographiert. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 7 ml pro Stunde werden Fraktionen von 1,4 ml aufgefangen. Nach einem Elutionsvolumen von 130 ml Puffer ist keine ADH_L-Aktivität nachweisbar. Sie erscheint nach Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten 0 - 1 molar. Die enzymatische Aktivität beträgt insgesamt 3,7 Einheiten, ihr Eiweißgehalt, gemessen über die Extinktion bei 280 nm in Quarzküvetten 0,96 mg.

Man erreicht an dieser Säule eine vollständige Trennung von Rinderserumalbumin und ADH_L.

Versuch zur affinitätschromatographischen Trennung von Rinderserumalbumin und LDH an kovalent an Thiopropyl-Sepharose 6B gebundenem [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat.

1 ml LDH-Kristallsuspension wird zwei Minuten lang mit

einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, das Sediment in wenig 0,01 m Phosphatpuffer pH 7 aufgeschlämmt, in einen Dialyseschlauch gefüllt und zusammen mit einem Rinderserumalbumin-Pufferlösung enthaltenden zweiten Dialyseschlauch 1 x 15 Stunden und 2 x 2 Stunden lang bei 4° C gegen je 1,8 l Phosphatpuffer pH 7 dialysiert. Bei 0° C wird zentrifugiert und die enzymatische Aktivität bei 25° C gemessen; sie beträgt 218 U/ml (67).
Durch eine quantitative Proteinbestimmung wird der Eiweißgehalt beider dialysierter Lösungen ermittelt:
Eiweißkonzentration des Enzymdialysats: 4,62 mg/ml
Albuminkonzentration: 14,19 mg/ml

Eine 0,56 cm Ø x 33 cm große Thiopropylsepharose-Säule mit einem Gehalt von 8 µMol Coenzymanalogon pro ml feuchten Gels wird bei 4° C mit 50 ml 0,01 m Phosphatpuffer pH 7 äquilibriert.
Eine 250 µl Probe, die 0,7 mg Rinderserumalbumin und 43 Einheiten LDH im Äquilibrierpuffer gelöst enthält, wird bei einer Tropfgeschwindigkeit des Elutionspuffers von 5,3 ml/h an dieser Säule eluiert. Es werden 1,5 ml-Fraktionen aufgefangen, in denen die enzymatische LDH-Aktivität und die Proteinabsorption bei 280 nm bestimmt werden. Anschließend wurde restliches Enzym durch einen linearen NaCl-Gradienten (1 m nach 80 ml Elutionsvolumen 36 ml) zum Elutionspuffer eluiert. Mit NAD (bis 7,7 mM = 77 ml) wurde die Säule gewaschen.

Versuch zur affinitätschromatographischen Trennung von Rinderserumalbumin und ADH_H an kovalent an Thiopropyl-Sepharose 6B gebundenem [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat.

Im Dialyseschlauch werden ca. 1,5 ml ADH_H-Suspension und 2 ml Rinderserumalbuminlösung 3 x 1,5 Stunden und über Nacht gegen 1,8 l 0,01 m Phosphatpuffer pH 7 bei 4° C dialysiert. Man zentrifugiert vom Ungelösten ab und ermittelt nach entsprechender Verdünnung die enzymatische Aktivität im Enzymdialysat bei 25° C durch Auslösen der Redoxreaktion zwischen Äthanol und NAD^+ = 1444 U/ml.

Eine quantitative Proteinbestimmung ergibt:
für die Enzymlösung 7,92 mg/ml
für die Albuminlösung 13,2 mg/ml.

Eine 0,50 cm ∅ x 3 cm Thiopropylsepharose-Säule mit einem Gehalt von 8 µMol [4-(3-Acetylpyridinio)butyl]-adenosin-pyrophosphat pro ml feuchten Gels wird über Nacht mit 5 ml 0,01 m Phosphatpuffer pH 7 äquilibriert. Es wird eine Mischung von 3,60 mg Rinderserum-Albumin und 144 Einheiten ADH_H (0,79 mg), gelöst in 150µl obigen Puffers, auf diese Säule aufgetragen und dann mit Äquilibrierpuffer bei 4° C eluiert. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 4,0 ml/h werden 0,8 ml-Fraktionen aufgefangen. Im Eluat wird die Extinktion bei 280 nm, dem Maximum der Proteinabsorption registriert und die ADH_H -

Aktivität ermittelt.

Nach einem Durchflußvolumen von 78 ml wird der Elutionspuffer mit einem linear ansteigenden Salzgradienten (0 - 2 m nach 160 ml = Gesamtvolumen 77 ml) versetzt.

Eine vollständige Ablösung wird durch Anlegen eines AMP - Gradienten (von 0 - 20 mM nach 120 ml) erzielt.

Methoden und Materialien

Quantitative Phosphatbestimmung (54)

Eine Probe wird in einem Kjeldahlkölbchen mit 1 ml 30%iger H_2SO_4 (Vol./Vol.) erhitzt bis weiße Nebel entweichen und Verkohlung eintritt. Nach dem Abkühlen fügt man 2 Tropfen Perhydrol zu und dampft erneut solange ein bis weiße Nebel auftreten. Ist keine Entfärbung der Lösung eingetreten, wird nach Abkühlung durch Zugabe weiterer Tropfen H_2O_2 die Oxidation mit Perhydrol wiederholt. Dann werden 10 ml Aqua bidest. zugefügt und vorsichtig 10 Minuten gekocht. Man läßt abkühlen und spült die restliche Lösung quantitativ in einen 10 ml Meßzylinder. Zu der Lösung werden nacheinander 1 ml 10%ige Ammoniumheptamolybdat-Lösung und 1 ml Hydrochinonsulfit-Lösung (20%ig an Na_2SO_3, 5%ig an Hydrochinon) pipettiert und mit Aqua bidest. auf 10 ml aufgefüllt.
Bei der Eichung und dem Blindwert wird noch 1 cm^3 30%ige H_2SO_4 zugesetzt und dann auf 10 ml verdünnt. Es wird gut durchmischt und nach 35 Minuten die Extinktion der Lösung bei 578 nm und Schichtdicke 2 cm im Photometer Eppendorf gegen Blindwert gemessen. Durch Vergleich mit einer Eichkurve kann der Phosphorgehalt in μMol oder mg ermittelt werden. Eichkurven können über Phosphatbestimmung einer $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ - Eichlösung (1,07940 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$/ 500 ml = 0,4285 mg P/ml bzw. 13,837 μMol P/ml) oder einer

K_2HPO_4 - Eichlösung (1,1114 g K_2HPO_4/500 ml = 0,393 mg P/ml bzw. 12,762 µMol P/ml) aufgestellt werden. Wegen des genau definierten Molekulargewichtes ist die Verwendung des Dihydrates von Vorteil.

Wird anorganisches Phosphat zur Eichung benutzt, muß nicht verascht werden; man kann die Probe mit 0,07 - 0,7 µMol P direkt in den Meßzylinder, der 1 cm^3 30%iger H_2SO_4 in wässriger Verdünnung enthält, pipettieren, mit obigen Reagenzlösungen auf 10 ml auffüllen und wie schon beschrieben weiter verfahren.

Um zu überprüfen ob bei dem angewandten Verfahren der Veraschung eine vollständige Hydrolyse organisch gebundenen Phosphats eintritt, wird die mittels anorganischen Phosphats gewonnene Eichkurve verglichen mit einer durch Phosphatbestimmung einer AMP-Dinatriumsalz-Eichlösung bekannten Phosphorgehaltes (15,9 mg AMP-Dinatriumsalz, gelöst in 3,1 ml, genaue Konzentrationsbestimmung über Messung der Extinktion bei 260 nm in 1 cm Quarzküvette $\varepsilon = 15 \cdot 10^{-3}$ $cm^{-1}Mol^{-1}$ $E_{260} = 0,186$ c = 1,25 µMol P/ml) erhaltenen. Proben mit 0,12 bis 0,7 µMol P werden wie oben beschrieben verascht und weiterbehandelt.

Eichwerte gewonnen mit K_2HPO_4

µMol/Ansatz	ΔE_{578} d = 2 cm
0,068	0,030
0,127	0,057
0,195	0,087
0,254	0,111
0,381	0,184
0,508	0,233
0,635	0,298

Eichwerte gewonnen mit $NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$

µMol/Ansatz	ΔE_{578} d = 2 cm
0,069	0,033
0,138	0,066
0,207	0,100
0,276	0,129
0,415	0,207
0,553	0,279
0,692	0,330

Eichwerte gewonnen mit AMP-Dinatriumsalz

µMol Phosphat pro Ansatz	ΔE_{578} nm
0,125	0,046
0,250	0,115
0,375	0,190
0,500	0,250
0,625	0,305

Aktivitätsbestimmung von GAPDH, LDH, ADH_H, ADH_L .

Enzymaktivitäten werden in internationalen Einheiten angegeben. Unter einer Enzymeinheit versteht man die Enzymmenge, die bei 25° C unter definierten Bedingungen den Umsatz von 1 µMol Substrat pro Minute katalysiert. Es ist üblich, die Aktivitäten gelöster Enzyme durch die Angabe U/ml auf das Volumen ihrer Lösung zu beziehen, wobei U/ml die sich in 1 ml Enzymlösung befindlichen Enzymeinheiten bedeuten.

In der durch NAD-abhängige Dehydrogenasen katalysierten Reaktion ist die Bildung oder der Verbrauch von NADH der beobachteten Extinktionsänderung der Reaktionslösung bei 366 nm proportional, die Geschwindigkeit der Extinktionsänderung dagegen der Enzymkonzentration. So hat bei einem Lichtweg von 1 cm der Umsatz von 1 µMol NADH eine Extinktionsänderung von $\Delta E_{366} = 3,3$ zur Folge. Mißt man umgekehrt die Zeit in Minuten, in der sich die Extinktion der Reaktionslösung um einen bestimmten Betrag ändert nachdem ein definiertes Volumen Enzymlösung zugegeben wurde, ergibt sich aus der Division der gemessenen Extinktionsänderung pro Minute durch den Extinktionskoeffizienten $\varepsilon^{366}_{NADH} = 3,3$ ($cm^2/\mu Mol$) und Multiplikation mit dem Volumen der Reaktionslösung die pro Zeiteinheit gebildete Menge NADH in µMol. Die Aktivität des zugegebenen Enzyms - bezogen auf das Volumen der Enzymprobe - kann in U/ml

angegeben werden als:

$$\text{Aktivität} = \text{U/ml} = \frac{\text{E/min} \cdot \text{V}}{\varepsilon^{366}_{\text{NADH}} \cdot \text{v} \cdot \text{d}} \cdot \text{Verd.}$$

Hierbei bedeuten:

E/min = Extinktionsanstieg min^{-1} bei 366 nm

V = Volumen der Reaktionslösung in der Küvette (ml)

v = Volumen der Enzymlösung (ml)

Verd. = Verdünnungsfaktor der Enzymlösung

$\varepsilon_{\text{NADH}}$ = Extinktionskoeffizient von NADH bei 366 nm (3,3 $\text{cm}^2/\mu\text{Mol}$)

d = Küvettenschichtdicke (hier d = 1 cm)

Ausgelöst wird die enzymatische Reaktion in der Küvette durch Zugabe von 10 - 20 μl Enzymlösung zum Testansatz und schnelles Vermischen mittels eines Plastiklöffelchens. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität im Eluat waren die eingemischten Enzymvolumina 50 - 100 μl groß.
Die Enzymlösung wurde im allgemeinen so stark verdünnt, daß die Zeit, in der die Anzeige des Eppendorf-Photometers die Strecke zwischen den Extinktionswerten 0,03 - 0,13 durcheilt, bequem mit einer Stoppuhr zu messen war.

Aktivitätsbestimmungen werden bei 25° C in Halbmikro-Küvetten der Schichtdicke 1 cm durchgeführt.

Aktivitätsbestimmung von LDH

In die Küvette werden nacheinander pipettiert:

1,000 ml 0,2 m Glycin/NaOH-Puffer pH 10,0
0,050 ml NAD^+-Lösung ($0,6 \cdot 10^{-2}$m)
0,100 ml Lithium-DL-lactat (c = 2,3m)
Die Reaktion wird ausgelöst durch Zugabe von
0,020 ml LDH-Lösung.

Aktivitätsbestimmung von ADH_L und ADH_H

In die Küvette werden nacheinander pipettiert:

1,000 ml 0,2 m Glycin/NaOH-Puffer pH 9,5
0,100 ml NAD^+-Lösung (8,7 mM)
0,050 ml Äthanol
Die Reaktion wird ausgelöst durch Zugabe von
0,010 ml Enzymlösung

Aktivitätsbestimmung von GAPDH

In die Küvette werden nacheinander pipettiert:

1,000 ml Testpuffer pH 8,9
0,100 ml NAD^+-Lösung (10 mM)
0,100 ml D-GAP-Stammlösung (10 mM)
Die Reaktion wird ausgelöst durch Zugabe von
0,010 ml GAPDH-Lösung

Quantitative Proteinbestimmung (59)

0,1 ml Proteinlösung mit einem Proteingehalt zwischen 10 mg/ml und 60 mg/ml werden mit H_2O auf etwa 1,7 ml verdünnt und 0,3 ml 3 m Trichloressigsäure zu dieser Mischung gerührt. Das Gefällte wird abzentrifugiert und der Überstand sorgfältig dekantiert. Der Niederschlag wird mit 1 ml H_2O aufgeschlämmt und mit genau 5 ml Biuretreagens unter Rühren mit einem Glasstab vermischt. Nach 30minütigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wird auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt und die Extinktion dieser Lösung bei 546 nm (Schichtdicke d = 2 cm) gemessen. Eine 1 : 1 mit Wasser verdünnte Lösung des Biuret-Reagens' wird als Blindwert verwendet. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen Blindwert und Bestimmungswert berechnet sich die Konzentration der Proteinlösung in mg/ml:

$$16{,}5 \times 10 \left(E_{Best.} - E_{Blind.} \right) = \text{Konzentration (mg/ml)}$$

Materialien

Biuretreagens

9 g Kalium-Natrium-Tartrat werden in etwa 400 ml 0,2 n Natronlauge gelöst. Zu dieser Lösung werden jeweils unter vollständiger Auflösung nacheinander 3 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ p.a. und 5 g KJ p.a. zugefügt. Die Mischung wird mit 0,2 n Natronlauge auf 1000 ml aufgefüllt und in einer braunen Flasche lichtgeschützt aufbewahrt.

Reaktionslösung für Cyanid-Addition

1/20 Mol KCN und 1/10 Mol $KHCO_3$ werden in ca. 90 ml Wasser gelöst und mit Kalilauge auf pH 12,5 eingestellt, anschließend wird auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt.

Herstellung der D-GAP-Stammlösung

100 mg D,L-GAP-Diäthylacetal-mono-Bariumsalz werden in einer Suspension von 2 g Dowex 50 x 8 (Dowex wird vorher mit kochendem Wasser und heißem Alkohol gewaschen) gelöst und die Mischung 4 Minuten in ein kochendes Wasserbad gehalten. Anschließend wird zügig vom Kationenaustauscher abfiltriert und mit soviel Wasser nachgewaschen, daß das in einem eisgekühlten Meßzylinder aufgefangene Filtratvolumen insgesamt 10 ml beträgt. Die Lösung ist dann 0,01 molar an GAP und bei - 20° einige Tage haltbar.

Pufferlösungen

LDH - Testpuffer

0,2 Mol Glycin werden in 1 Liter H_2O
gelöst; mit 2 n NaOH wird pH 10,0 eingestellt.

ADH - Testpuffer

0,2 Mol Glycin werden in 1 Liter H_2O
gelöst; mit 2 n NaOH wird pH 9,5 eingestellt.

GAPDH - Testpuffer

0,7426 g Triäthanolamin-Hydrochlorid
0,89 g Dinatriumhydrogenphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$)
8,3 mg EDTA
werden in 90 ml Wasser gelöst, mit 20%iger
Ammoniaklösung pH 8,9 eingestellt und auf
100 ml mit Wasser verdünnt.

Sepharose-Quellpuffer

15,6 g (0,1 Mol) $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$
0,336 g (1 mMol) Na_2-EDTA
löst man in 1 Liter destilliertem Wasser auf
und stellt mit 2 n Natronlauge auf pH 7,0 ein.

Puffer zur Gelreduktion

0,06 Mol Natriumhydrogencarbonat
58 mg EDTA
werden in 200 ml Wasser gelöst und mit 2 n Natronlauge wird pH 8,4 eingestellt.

$CH_3COO/HCOOH$ - Puffer pH 1,9

Lösung aus 50 ml Ameisensäure,
150 ml Eisessig und 800 ml Wasser.

Dialysepuffer

0,01 Mol $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$
83 mg EDTA
werden in Wasser gelöst, mit Natronlauge pH 7,0 eingestellt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Phosphatpuffer zur Jodacetamidblockierung

0,1 Mol (15,6 g) $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$
1 mMol (0,292 g) EDTA
werden in bidestilliertem Wasser gelöst.
Der pH-Wert wird mit 2 n Natronlauge auf 7,0 eingestellt und die Lösung auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml gebracht.

Sepharose-Waschlösung

0,2 Mol (12 g) Eisessig

1 Mol (58,44g) NaCl

2 mMol (0,67g) Na_2-EDTA

werden in insgesamt 2000 ml Wasser gelöst.

Füllmaterialien für Chromatographiesäule

Thiopropyl-Sepharose 6B ist ein Produkt der Firma Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden.

Dowex 50 W x 8 (200-400 mesh)

ist ein Kationenaustauscher und wird von der Firma Serva Feinbiochemika, Heidelberg bezogen. Zur Überführung in die H^+ Form wäscht man ihn nacheinander mit: 4 m NaCl-Lösung (Na^+Form), Wasser (chloridfrei), Methanol (frei von methanollöslichen Verbindungen), Wasser (methanolfrei), 4 m Salzsäure (frei von Na^+Ionen), Wasser (salzsäurefrei). Er wird in bidestilliertem Wasser suspendiert aufbewahrt.

Biomaterialien und Chemikalien	Lieferant
LDH, ADH_L, ADH_H, GAPDH	Fa. Boehringer,
Suspensionen in Ammoniumsulfat	Mannheim
NAD^+, NADH	Fa. Boehringer,
D,L-Glycerinaldehyd-3-phosphat-diäthylacetal mono-Bariumsalz	Mannheim
Rinderserumalbumin	Fa. Behring, Marburg
AMP-Säure	Fa. Pharma Waldhof,
AMP-Dinatriumsalz	Aschaffenburg
EDTA-Säure	Fa. Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz	
Lithium-D-L-lactat	
Dithioerythrit	
Triäthanolamin-hydrochlorid	
Glycin	
$CuSO_4$ x 5 H_2O	
Kaliumjodid	
Kalium-Natrium-Tartrat	
Äthanol	
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	
Hydrochinon	
Natriumsulfit	
NaH_2PO_4 x 2 H_2O	
KH_2PO_4	
Kaliumcyanid	
Natriumhydrogencarbonat	
Diäthyläther	
Aceton	
Brom	

und weitere Chemikalien waren Produkte der Fa. Merck, Darmstadt.

Geräte	Hersteller
Fraktionssammler Ultraroc und Uvicord 4700	LKB-Produkter AB, Stockholm, Schweden
Photometer Eppendorf mit thermostatisiertem Küvettenhalter und registrierendem Schreiber (zur Extinktionsmessung bei konstanter Wellenlänge)	Firma Eppendorf, Gerätebau, Netheler u. Hinz GmbH, Hamburg
UV-Spektrophotometer Typ Cary Mod. 14 mit registrierendem Schreiber (zur Aufnahme von UV-Absorptionsspektren)	Firma Applied Physics Corp.
UV-Spektrophotometer Typ 124	Firma Perkin-Elmer, Überlingen
Glaselektrode Typ LOT 403-M8 zur pH-Messung	Firma Ingold KG, Frankfurt

Abkürzungen

LDH	= Lactat-Dehydrogenase (Schweineherz)
GAPDH	= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Kaninchenmuskel)
ADH_L	= Akohol-Dehydrogenase (Leber)
ADH_H	= Alkohol-Dehydrogenase (Hefe)
AMP	= Adenosinmonophosphat
ADP	= Adenosindiphosphat
NAD	= Nicotinamid-Dinucleotid
APNAD	= 3-Acetylpyridinio-ribofuranosyl-adenosin-pyrophosphat
GAP	= Glycerinaldehyd-3-phosphat
EDTA	= Ethylendiamintetraessigsäure
U	= internationale Einheit der Enzymaktivität
Δ	= Differenzsymbol
E	= Extinktion

Literaturverzeichnis

1.) P. Cuatrecasas und C.B. Anfinsen "Methods in Enzymology" Vol 22 (1971) 345-378

2.) P. Cuatrecasas, M.Wilchek u. C.B. Anfinsen (1968) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 61, 636-643

3.) P. Cuatrecasas u. C.B.Anfinsen, Ann.Rev. Biochem. 40, 259-275

4.) J.Porath "Methods in Enzymology" 34 (1974) 13-30

5.) J.C. Venter, J.E. Dixon, P.R.Maroko, N.O.Kaplan Proc.Nat.Acad.Sci. USA (1972) 69, 1141-1145

6.) P.J.Robinson, P.Dunhill u. M.D. Lilly, Biochem. Biophys.Acta 242 (1971) 659-661

7.) J.K.Inman, H.M.Dintzis,Biochem.8 (1969) 4074-4082

8.) T.Ternynck,S.Avrameas Febs Lett. 23 (1972) 24-28

9.) C. Arsenis u. D.B.Mc.Cormick, J.Biol.Chem. 239 (1964) 3093-3097

10.) C.Arsenis u. D.B.Mc.Cormick, J.Biol.Chem. 241 (1965) 330-334

11.) P.T. Gilham "Methods in Enzymology" 21 (1971) 191-197

12.) D.B. McCormick, Ann.Biochem. (1965) 13, 194-198

13.) C.R.Lowe u.P.Dean, Febs Lett. (1971) 14, 313-316

14.) R.Lamed, Y.Levin u. M.Wilchek, Biochim.Biophys. Acta (1973) 304, 231-235

15.) Broschüre der Fa. Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden (1979) Affinity Cromatography

16.) J. Porath u.L. Sundberg, Nature 238 (1972) 261

17.) J. Porath u.L. Sundberg, J. of Chromat. 90 (1974) 87-98

18.) R. Axén, A.Drevin, J.Carlsson, Acta Chem.Scand. 29 (1975) 471-474

19.) P.Cuatrecasas, J.Biol.Chem. (1970) 245, 3059-3065

20.) P.Cuatrecasas, Nature 228 (1970), 1327-1328

21.) P. O'Carra, Febs Symp. on "Industrial aspects of Biochemystry" (1974) 107

22.) P. O'Carra, S.Barry u. T.Griffin, Biochem.Soc. Trans. 1 (1973) 289-290

23.) C.R.Lowe, K.Mosbach, P.D.G.Dean, Biochem.Biophys. Com. 48 (1972) 1004-1010

24.) R.Ohlsson, P.Brodelius, K.Mosbach, Febs Lett. 25 (1972) 234-238

25.) D.B.Craven, M.Harvey, C.Lowe, P.D.G.Dean, Eur.J. Biochem. 41 (1974) 329-357

26.) M.Lindberg, P.Larsson, K.Mosbach, Eur.J.Biochem. 40 (1973) 187-193

27.) P.O!Carra, S.Barry Febs Lett. 21 (1972) 281-285

28.) N.O.Kaplan, J.Everse, J.Dixon, F.E.Stolzenbach, C.Y.Lee, C.L.T.Lee, S.S.Tayler, K.Mosbach, Proc. Nat.Acad.Sci. USA(1974) 71, 3450-3454

29.) S.Barry, P.Brodelius, K.Mosbach Febs Lett. (1976) 70, 261-266

30.) I.P.Trayer, H.R.Trayer; D.A.P.Small, R.C.Bottomley, Biochem.J. 139 (1974) 609-623

31.) I.P.Trayer, H.R.Trayer,Biochem.J.141 (1974)775-787

32.) P.Brodelius, P.O.Larsson, K. Mosbach Eur.J.Biochem. 47 (1974) 81-89

33.) M.O.Mansson, S.Gestrelius, K.Mosbach Eur.J.Biochem. (1975) 57, 529-535

34.) S.Barry u. P.O'Carra, Febs Lett. 37 (1973) 134-139

35.) Y.J.Lee, N.O. Kaplan Arch.Biochem.Biophys. (1975) 168, 665-676

36.) C.Y.Lee, D.A.Lappi, B.Wermuth, J.Everse u. N.O. Kaplan, Arch.Biochem.Biophys. 163 (1974) 561-569

37.) S.Barry u.P.O!Carra, Biochem.J. 135 (1973) 595-607

38.) K.Mosbach, H.Guilford, R. Ohlsson, M. Scott Biochem.J. (1972) 127, 625-631

39.) M.J.Harvey, D.B.Graven, C.R. Lowe, P.D.G. Dean "Methods in Enzymology" Vol 34, 242-253

40.) R.Jeck, G.Wilhelm, Liebigs Ann.Chem.(1973) 531-543

41.) R.Jeck, P.Zumpe, C. Woenckhaus, Liebigs Ann. Chem. (1973) 961-968

42.) C. Woenckhaus u. R. Jeck "Methods in Enzymology" Vol 46, 249-258

43.) C.Woenckhaus, M.Zoltobrocki, J.Berghäuser, Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. (1970) 351, 1441-1448

44.) C.Woenckhaus, E.Schättle, R.Jeck, J.Berghäuser Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem.(1972) 353, 559-564

45.) V.Berariu, R.Jeck, C.Woenckhaus, Liebigs Ann. Chem. (1978) 118-123

46.) R. Jeck, Z.Naturf. 32c (1977) 550-556

47.) Broschüre der Fa. Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Schweden "Thiopropyl-Sepharose 6B"

48.) K. Brocklehurst, J.Carlsson, M.P.J. Kierstan, E.M. Crook, BiochemJ. 133 (1973) 573

49.) G.L.Ellmann, Arch.Biochem.Biophys. 74 (1958) 443-450

50.) G.L.Ellmann, Arch.Biochem.Biophys.(1959) 82,70-77

51.) P.D.G. Dean u.C.R. Lowe, Biochem.J.127 (1972)11-12

52.) H.F. Hixson jun. u. A.H. Nishikawa Arch.Biochem. Biophys. 154 (1973) 501

53.) P.J. Graves, Yun Tai Wu "Methods in Enzymology" Vol 34, 140-162

54.) M. Martland u. R. Robison (1926) Biochem.J. 20 847-855

55.) O.Warburg,W.Christian, Biochem.Z.(1936) 286, 81-82

56.) O.Warburg, W.Christian, Biochem.Z. 286, 142

57.) Cotton, Wilkinson, Advanced Inorganic Chemistry b. John Wiley a.S., New York-London 873

58.) C.H. Fiske u. Y. Subbarow, J.Biol.Chem. (1925) 66, 375-400

59.) G.Beisenherz, H.J.Boltze, Th.Bücher, R.Czok, K.H. Garbade, E.Meyer-Arendt u. G. Pfleiderer Z.Naturf. 8b, 555-577 (1953)

60). Colowick, N.O. Kaplan, N.O. Ciotti (1951) J.Biol.Chem. 191, 447-459

61.) C.I. Brändén, H. Jörnvall, H.Eklund, B.Furogren, in The Enzymes 3rd edn.b. P.D.Boyer, Academic Press Vol 11, 93-190

62.) D. Eby u.M.E. Kirtley, Biochem. 10 (1971 2677-2682

63.) Kühn, Diplomarbeit, Frankfurt

64.) A. Mc.Pershon, J.Mol.Biol. (1970) 51, 39-46

65.) C.W. Niekamp, H.J. Hinz, R. Jaenicke, C. Woenckhaus, R. Jeck, Biochem. 19 (1980) 3144

66.) K. Chandrasekhar, A.Mc. Pershon, M.J. Adams, M.G. Rossmann, J.Mol.Biol. 76 (1973) 503-518

67.) J.B. Neilands in "Methods in Enzymology" Vol 1 (1955) 449-454

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel
"Einfache Trennung von Dehydrogenasen an einem neu entwickelten Affinitätssorbens"
im Gustav-Embden-Zentrum der Biologischen Chemie in der Abteilung für Enzymologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Woenckhaus ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Mittel benutzt habe.
Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hanau am Main, den 25.4.82

Harald Pauli

Lebenslauf

31. 3.50	geboren in Hanau am Main
ab 1957	Schulbesuch in Hanau, zunächst Grundschule, dann Hohe Landesschule, Gymnasium in Hanau
Juni 1970	Abitur an der Hohen Landesschule in Hanau
1970 - 1971	Bundeswehr
ab 1972	Studium der Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Ffm.
März 1974	Diplomchemiker-Vorexamen
ab 1976/77	Studium der Zahnmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Ffm.
September 77	naturwissenschaftliche Vorprüfung Zahnmedizin
September 79	zahnärztliche Vorprüfung

Harald Pauli

Koczy-Druck, Oppenheimer Landstr. 29, 6000 Ffm. 70, Tel. 069/62 21 91